

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

**EP 0 802 259 A1**

(12)

**EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:  
22.10.1997 Patentblatt 1997/43

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: **C12N 15/54**, C12N 9/10,  
C12P 19/18

(21) Anmeldenummer: 97106357.3

(22) Anmeldetag: 17.04.1997

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
BE DE DK FI FR GB IT NL

(30) Priorität: 18.04.1996 DE 19615336

(71) Anmelder:  
Consortium für elektrochemische Industrie GmbH  
D-81379 München (DE)

(72) Erfinder:  
• Schulz, Georg E., Dr.  
79211 Denzlingen (DE)

- Parsiegla, Goetz, Dr.  
79102 Freiburg (DE)
- Candussio, Anton, Dr.  
81825 München (DE)
- Wich, Günter, Dr.  
81379 München (DE)

(74) Vertreter: Potten, Holger et al  
Wacker-Chemie GmbH  
Zentralabteilung Patente,  
Marken und Lizenzen  
Hanns-Seidel-Platz 4  
81737 München (DE)

(54) **Cyclodextringlycosyltransferasen zur Produktion von gamma-Cyclodextrin**

(57) CGTasen, welche bei der Umsetzung von Stärke oder stärkeähnlichen Substraten zu CD in erhöhtem Ausmaß  $\gamma$ -CD produzieren und noch mindestens 60 % der spezifischen Gesamt-CGTase-Aktivität der zur Herstellung des betreffenden Enzyms verwendeten Ausgangs-CGTase aufweisen, dadurch gekennzeichnet, daß sich ihre Aminosäuresequenz von der Aminosäuresequenz bekannter CGTasen im Bereich von Aminosäureposition 155 bis einschließlich Aminosäureposition 195 durch die Deletion mindestens einer Aminosäure unterscheidet; wobei Position 1 der Proteinesequenz der Beginn des Signalpeptids der CGTase ist und die Deletion die Erhöhung der  $\gamma$ -CGTase Aktivität des Proteins bewirkt.

EP 0 802 259 A1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft Cyclodextringlycosyltransferasen (CGTasen) EC 2.4.1.19 zur Produktion von  $\gamma$ -Cyclodextrin, Verfahren zur Herstellung von  $\gamma$ -Cyclodextringlycosyltransferasen und ihre Verwendung.

Cyclodextrine werden in der Regel aus Stärke oder stärkeähnlichen Substraten hergestellt. Stärke wird dabei mit CGTasen enzymatisch in Cyclodextrin (CD) umgewandelt. Aus thermodynamischen Gründen wird die Stärke unabhängig von der zur Umsetzung verwendeten CGTase hauptsächlich in  $\beta$ -CD umgewandelt, wenn die Reaktion bis zum Erreichen des thermodynamischen Gleichgewichts (maximaler CD-Ertrag) durchgeführt wird. In der Initialphase, zu Beginn der Stärkekonversionsreaktion jedoch unterscheiden sich die zur Konversion verwendeten Enzyme in der Zusammensetzung des primären Produktgemisches. In Abhängigkeit von dem in dieser Initialphase durch das Enzym hauptsächlich gebildeten Produkt,  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -CD, wird unterschieden zwischen  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -CGTasen.

Solche zur industriellen CD-Produktion geeigneten und auch bereits verwendeten Enzyme wurden bisher ausschließlich bei Bakterien nachgewiesen.  $\alpha$ -CGTasen wurden bisher ausschließlich bei *Bacillus macerans*, *Bacillus stearothermophilus* und *Klebsiella oxytoca* identifiziert.  $\beta$ -CGTasen wurden zum Beispiel bei *Bacillus circulans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus ohbensis*, *Micrococcus* sp. und taxonomisch nicht exakt klassifizierten alkalophilen Bacillen wie *Bacillus* sp. 38-2, 17-1, 1011, oder 1-1 nachgewiesen. Natürlich vorkommende Enzyme mit einer initial hohen  $\gamma$ -CD-Bildungsaktivität wurden aus *Bacillus subtilis* 313, *Bacillus* sp. AI-6 und *Bacillus* sp. 290-3 beschrieben.

Da die bei der industriellen Herstellung von Cyclodextrinen verwendeten CGTasen bei der Umwandlung von Stärke in Cyclodextrine immer Gemische aus mehreren Cyclodextrinen liefern, wurden verschiedene Verfahren zur Gewinnung reiner Cyclodextrine ( $\alpha$ ,  $\beta$  oder  $\gamma$ ) entwickelt. Diese sind im folgenden dargestellt:

Definierte CD's können aus den Produktgemischen, z. B. aufgrund ihrer Molekulargewichtsunterschiede, chromatographisch abgetrennt werden (beschrieben beispielsweise in US-A-4,808,232).

Bei der enzymatischen Umwandlung von Stärke in Cyclodextrine werden in der Regel Komplexbildner zugesetzt, die nur mit einem definierten CD reagieren und mit ihm z. B. einen unlöslichen Komplex bilden, der dann physikalisch aus dem Reaktionsgemisch abgetrennt werden kann. Anschließend wird der Komplex aufgelöst und das homogene CD gewonnen (beschrieben beispielsweise in EP 0291067).

Durch die Zugabe eines organischen Lösungsmittels, wie z. B. Äthanol, zum Reaktionsgemisch kann die Produktzusammensetzung bei Verwendung einer  $\gamma$ -CGTase in Richtung  $\gamma$ -CD verschoben werden (J. Ferm. Bioeng. (1990) 70 (3), S. 150-154).

Bei jedem der Verfahren werden optimalerweise solche CGTasen verwendet, die eine möglichst hohe initiale Produktbildungspräferenz für das CD besitzen, das rein hergestellt werden soll.

Die Spezifität der bisher bekannten  $\alpha$ - und  $\beta$ -CGTasen ist ausreichend für eine technische Produktion der entsprechenden Cyclodextrine. Im Gegensatz dazu besitzt keine der bekannten, natürlich vorkommenden  $\gamma$ -CGTasen eine Produktspezifität, die eine vergleichbare technische  $\gamma$ -CD-Produktion ermöglicht.

Zur Herstellung von  $\gamma$ -CD wurde daher in CA 115:157165 vorgeschlagen,  $\alpha$ - und/oder  $\beta$ -Cyclodextrine enzymatisch durch die Zugabe des  $\gamma$ -CD-spezifischen Komplexbildners Glycosylglycyrrhizin, Maltose und einer CGTase in  $\gamma$ -CD umzuwandeln.

Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung von  $\gamma$ -CD besteht darin, durch Austausch definierter Aminosäurereste die  $\gamma$ -CD - Spezifität einer  $\beta$ -CGTase so zu erhöhen, daß das mutagenisierte Enzyme vermehrt  $\gamma$ -CD produziert und damit zur technischen Herstellung von  $\gamma$ -CD verwendet werden kann. Entsprechende Mutationen sind bekannt und z.B. in DE 43 24 650 A1 (entspricht US-A-5,474,917), Biochemistry. (1994) 33 (33), S. 9929-9936, Biochemistry. (1995) 34 (10), S. 3368-3376 und J. Biotech. (1994) 32, S. 283-288 beschrieben.

Solche CGTase - Derivate, die durch Mutagenese von  $\beta$ -CGTasen erzeugt wurden, besitzen eine erhöhte  $\gamma$ -CD - Spezifität und sind damit aufgrund ihrer Produktspektren prinzipiell zur technischen Herstellung von  $\gamma$ -CD geeignet. Nachteilig ist jedoch, daß die spezifischen Aktivitäten der zur Mutagenese verwendeten Ausgangsenzyme durch die Einführung der jeweiligen Mutationen reduziert werden. In Abhängigkeit von den eingeführten Aminosäureresten besitzen mutierte Enzyme mit einer erhöhten  $\gamma$ -CD - Spezifität nur noch zwischen 25 % und 50 % der CD - Bildungsaktivität des Ausgangsenzyms (Biochemistry. (1994) 33 (33), S. 9929-9936, Biochemistry. (1995) 34 (10), S. 3368-3376).

Aufgabe der Erfindung war es, Cyclodextringlycosyltransferasen (CGTasen) zur Verfügung zu stellen, welche bei der Umsetzung von Stärke oder stärkeähnlichen Substraten zu CD in erhöhtem Ausmaß  $\gamma$ -CD produzieren und die noch mindestens 60 % der spezifischen Gesamt-CGTase-Aktivität der zur Herstellung des betreffenden Enzyms verwendeten Ausgangs-CGTase aufweisen.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung war es, Verfahren zur Herstellung der genannten CGTasen zur Verfügung zu stellen.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung war es, Verfahren zur Produktion von  $\gamma$ -CD zur Verfügung zu stellen.

Die erstgenannte Aufgabe wird gelöst durch CGTasen, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sich ihre Aminosäuresequenz von der Aminosäuresequenz bekannter CGTasen im Bereich von Aminosäureposition 155 bis einschließlich Aminosäureposition 195 durch die Deletion mindestens einer Aminosäure unterscheidet, wobei Position 1 der Proteinsequenz der Beginn des Signalpeptids der CGTase ist und die Deletion die Erhöhung der  $\gamma$ -CGTase Aktivität des Pro-

teins bewirkt.

Im Sinne der Erfindung ist unter Erhöhung der  $\gamma$ -CGTase Aktivität zu verstehen, daß im Produktgemisch, welches bei der Umsetzung von Stärke oder stärkeähnlichen Substraten mit CGTasen entsteht, der Quotient

5

$$\frac{\text{Menge gebildetes } \gamma\text{-CD}}{(\text{Menge gebildetes } \alpha\text{-CD} + \text{Menge gebildetes } \beta\text{-CD})}$$

größer wird.

10

Bevorzugt unterscheiden sich die Aminosäuresequenzen erfindungsgemäßer CGTasen von der Aminosäuresequenz bekannter CGTasen dadurch, daß im Bereich zwischen Aminosäureposition 155 und Aminosäureposition 195 ihrer Proteinsequenz zwischen vier und acht Aminosäurereste deletiert sind, wobei Position 1 der Proteinsequenz der Beginn des Signalpeptids der CGTase ist und die Deletion die Erhöhung der  $\gamma$ -CGTase Aktivität des Proteins bewirkt.

15

Besonders bevorzugt unterscheiden sich die Aminosäuresequenzen erfindungsgemäßer CGTasen von den Aminosäuresequenzen bekannter CGTasen dadurch, daß im Bereich zwischen Aminosäureposition 155 und Aminosäureposition 195 ihrer Proteinsequenz sechs Aminosäurereste deletiert sind, wobei Position 1 der Proteinsequenz der Beginn des Signalpeptids der CGTase ist und die Deletion die Erhöhung der  $\gamma$ -CGTase Aktivität des Proteins bewirkt.

Auch für die weiteren in der Anmeldung genannten Aminosäurepositionen gilt jeweils, daß Position 1 der Proteinsequenz der Beginn des Signalpeptids der CGTase ist.

20

Insbesondere bevorzugt sind ferner CGTasen, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sich ihre Aminosäuresequenzen von den Aminosäuresequenzen der in Tab.1 genannten CGTasen zumindest durch die Deletion der jeweils fettgedruckten Aminosäurereste unterscheidet, wobei die übrige Aminosäuresequenz der jeweiligen erfindungsgemäßen CGTase zur Aminosäuresequenz der in Tab.1 genannten CGTase soweit homolog ist, daß die Sequenz ohne die erfindungsgemäße Deletion CGTase Aktivität aufweist.

25

Beispiele für erfindungsgemäße CGTasen sind CGTasen, die aus den in Tab. 1 aufgeführten CGTasen oder aus anderen CGTasen durch Deletion einzelner Aminosäurereste im Bereich zwischen den Aminosäureresten 155 und 195 erhalten werden. Bevorzugt sind CGTasen, bei denen vier bis acht Reste im genannten Bereich deletiert sind. Besonders bevorzugt sind CGTasen, bei denen die in Tabelle 1 durch Fettdruck markierten sechs Aminosäurereste im genannten Bereich deletiert sind.

30

Weitere Beispiele für erfindungsgemäße CGTasen sind Enzyme, bei welchen die zu den in Tab. 1 genannten Aminosäuren homologen Aminosäuren deletiert sind, wobei diese Enzyme ohne die erfindungsgemäße Deletion CGTase Aktivität aufweisen.

Beispiele für erfindungsgemäße CGTasen sind ferner Enzyme bei welchen die in Tabelle 1 jeweils fettgedruckten Aminosäurereste im Bereich zwischen Aminosäureposition 155 und Aminosäureposition 195 deletiert sind wobei die übrige Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen CGTasen zur Aminosäuresequenz der CGTase aus dem jeweils in Tabelle 1 genannten Mikroorganismus soweit homolog ist, daß das Enzym, dessen Sequenz die erfindungsgemäße Deletion nicht enthält, CGTase Aktivität aufweist.

40

Tabelle 1

$\beta$ -CGTase aus	Position	Aminosäuresequenz
Bacillus ohbensis	160	-PNHSSPA LETDPS YAENGAVYNDG- (Seq. ID. No 1)
Bacillus macerans	165	-PNHTSPA DRDNPG FAENGGMVDNG- (Seq. ID. No 2)
Bacillus sp. 1-1	160	-PNHSSPA LETNPN YVENGAIYDNG- (Seq. ID. No 3)
Bacillus circulans #8	172	-PNHTSPA METDTS FAENGRLYDNG- (Seq. ID. No 4)

50

Die erfindungsgemäßen CGTasen besitzen unerwarteterweise eine höhere  $\gamma$ -CD Spezifität als die zu ihrer Herstellung verwendeten Ausgangs-CGTasen bei einer gleichzeitig nicht wesentlichen Reduktion der spezifischen Gesamt-CGTase-Aktivität des mutierten Enzyms im Vergleich zur Ausgangs-CGTase.

55

Die erfindungsgemäßen CGTasen produzieren somit bei der Umsetzung von Stärke oder stärkeähnlichen Substraten CD's in einer Produktverteilung, bei der der Quotient aus  $\gamma$ -CD und der Summe aus  $\alpha$ -CD und  $\beta$ -CD größer ist als der Quotient dieser Produkte, der bei der Stärkeumsetzung mit der jeweiligen unveränderten Ausgangs-CGTase erzielt wird.

Die Aufstellung in Tab.1 zeigt beispielhaft anhand einiger CGTasen den in CGTasen generell vorhandenen, homologen Aminosäuresequenzbereich, sowie für die Modifikation der Produktspezifität jeweils relevante sechs Aminosäu-

rereste innerhalb dieses Sequenzbereiches.

Als Position ist in Tab. 1 die Zahl der ersten Aminosäure der jeweils wiedergegebenen Aminosäuresequenz bezeichnet, wobei als Position 1 die erste Aminosäure des Signalpeptids der jeweiligen CGTase Sequenz gezählt wurde. Anhand von allgemein bekannten Standardverfahren läßt sich der entsprechende Sequenzbereich bei allen 5 CGTasen eruieren. Dies ist beispielsweise mittels bekannter Algorithmen, die multiple Sequenzalignments berechnen, möglich. Ein Beispiel für einen geeigneten Computeralgorithmus ist das Programm "pileup" aus dem kommerziell erhältlichen Sequenzanalyseprogramm Wisconsin Sequence Analysis Package (Genetic Computer Group, Madison).

Durch Mutagenese des dargestellten Bereiches in CGTasen lassen sich mittels bekannter Standardverfahren, wie sie beispielhaft auch in der vorliegenden Anmeldung ausgeführt sind, erfindungsgemäße Enzyme aus beliebigen 10 CGTasen herstellen. Dazu wird in der Regel ein für eine CGTase kodierendes Gen derart mutiert, daß es für eine erfindungsgemäße CGTase kodiert.

Die Erfindung betrifft somit auch Verfahren zur Herstellung von mutierten CGTase Genen, welche für erfindungsgemäße CGTasen kodieren, dadurch gekennzeichnet, daß die DNS-Sequenz eines für eine Ausgangs-CGTase kodierenden Gens mittels an sich bekannter Mutagenesemethoden derart mutiert wird, daß sich die durch die DNS-Sequenz 15 des mutierten Gens kodierte Aminosäuresequenz im Bereich zwischen Aminosäureposition 155 und 195 von der durch die DNS des unmutierten Gens kodierten Aminosäuresequenz durch die Deletion mindestens eines Aminosäurerestes unterscheidet.

Vorzugsweise wird im erfindungsgemäßen Verfahren die DNS-Sequenz eines für eine Ausgangs-CGTase kodierenden Gens mittels an sich bekannter Mutagenesemethoden derart mutiert, daß die durch die DNS-Sequenz des 20 mutierten Gens kodierte Aminosäuresequenz sich von der durch die DNS des unmutierten Gens kodierten Aminosäuresequenz durch die Deletion von vier bis acht Aminosäureresten im Bereich zwischen Aminosäureposition 155 und 195 unterscheidet.

Besonders bevorzugt wird im erfindungsgemäßen Verfahren die DNS-Sequenz eines für eine Ausgangs-CGTase kodierenden Gens mittels an sich bekannter Mutagenesemethoden derart mutiert, daß die durch die DNS-Sequenz 25 des mutierten Gens kodierte Aminosäuresequenz sich von der durch die DNS des unmutierten Gens kodierten Aminosäuresequenz durch die Deletion von sechs Aminosäureresten im Bereich zwischen Aminosäureposition 155 und 195 unterscheidet.

Die Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Herstellung von  $\gamma$ -CGTasen dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der beschriebenen DNS-Sequenzen in einem Mikroorganismus exprimiert wird.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen CGTasen sind die Gene aller CGTasen (Ausgangs-CGTasen) geeignet. 30 Ausgangs-CGTasen können alle natürlicherweise vorkommenden CGTasen sein, aber auch durch Mutagenese erhaltene CGTasen wie zum Beispiel solche CGTasen, bei denen das Produktbildungsverhältnis durch eine nicht erfindungsgemäße, andere Mutation (z. B.: wie in DE 43 24 650 A1, entspricht US-A-5,474,917, beschrieben) bereits verändert wurde. Ausgangs-CGTasen sind bevorzugt solche CGTasen, bei denen das Produktbildungsverhältnis durch 35 eine nicht erfindungsgemäße, andere Mutation (z. B.: wie in DE 43 24 650 A1 beschrieben) bereits verändert wurde.

Das für eine Ausgangs-CGTase kodierende Gen wird mittels bekannter Verfahren isoliert und die erfindungsgemäße Mutation wird in das Gen der CGTase durch "in vivo"- oder "in vitro"-Mutageneseverfahren eingeführt. Solche Verfahren sind ebenfalls im Stand der Technik allgemein bekannt.

Unter "in vivo"-Mutageneseverfahren sind besonders solche Methoden zu verstehen, bei denen Mikroorganismen, 40 die chromosomal und/oder episomal ein für eine CGTase kodierendes Gen enthalten, mit einem Mutagen wie z. B. UV-Licht, Nitrosoguanidin oder Ethylmethylsulfonat unspezifisch mutagenisiert werden. Ein solches Verfahren ist beispielsweise von Miller J. H. in (1972) Experiments in Molecular Genetics; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, N.Y. beschrieben worden.

Anschließend werden durch bekannte Methoden wie beispielsweise der Sequenzanalyse nach der von Sanger et 45 al. in PNAS 74 (1977) 5463-5467 beschriebenen Kettenabbruchmethode Mutanten identifiziert, bei denen im Bereich zwischen den Aminosäureresten 155 und 195 der entsprechenden CGTase zumindest ein für einen Aminosäurerest kodierendes Codon des CGTase-Gens deletiert ist.

Erfindungsgemäß bevorzugt werden unter den Mutanten solche ausgewählt, bei denen im genannten Bereich vier bis acht Codonen deletiert sind.

Besonders bevorzugt werden Mutanten ausgewählt, bei denen sechs Codonen deletiert sind, wobei nochmals bevorzugt solche Mutanten ausgewählt werden, bei denen die sechs Codonen deletiert sind, die für die in Tabelle 1 fettgedruckten Aminosäurereste oder die zu diesen homologen Aminosäurereste in anderen CGTasen kodieren.

Unter "in vitro"-Mutagenesemethoden sind im Sinne der Erfindung solche Methoden zu verstehen, bei denen ein isoliertes CGTase-Gen oder ein Fragment eines CGTase-Gens in an sich bekannter Art und Weise so modifiziert wird, 55 daß ein Gen entsteht, welches für ein CGTase-Enzym kodiert, bei dem im Bereich zwischen den Aminosäureresten 155 und 195 zumindest ein für einen dieser Aminosäurereste kodierendes Codon des CGTase-Gens deletiert ist.

Bevorzugt sind Mutanten, die so modifiziert wurden, daß im genannten Bereich vier bis acht Codonen deletiert sind. Besonders bevorzugt sind Mutanten, die so modifiziert wurden, daß im genannten Bereich sechs Codonen deletiert sind, wobei insbesondere Mutanten, die so modifiziert wurden, daß im genannten Bereich die sechs Codonen

deletiert sind, die für die in Tabelle 1 fettgedruckten oder die zu diesen homologen Aminosäurereste in anderen CGTasen kodieren, besonders bevorzugt sind.

Die Erfindung betrifft somit auch DNS-Sequenzen, die für erfindungsgemäße  $\gamma$ -CGTasen kodieren.

Aus dem Stand der Technik bekannte Verfahren zur "in vitro"-Mutagenese sind z. B. spezifische (BioTechniques (1992) 13 (3), S. 342-346) oder unspezifische (Technique (1989) 1 (1), S. 11-15) Mutageneseverfahren mit Hilfe der "PCR"-Technik. Ebenso sind Verfahren bekannt, bei denen die Mutation gerichtet mit Hilfe eines synthetisierten Oligonukleotids in das Zielgen eingebracht wird. Dies kann sowohl mittels sogenannter "Einzelstrangverfahren" (Ausubel F.M. et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates) oder auch mittels "Doppelstrangverfahren" (Promega 1992-1993 Catalogue, 150) oder mittels anderer Verfahren, wie sie beispielsweise in Ann. Rev. Genet. (1985) 19, S. 423-462 beschrieben werden, geschehen.

Das Hauptanwendungsgebiet der erfindungsgemäßen CGTase ist ihre Verwendung zur Gewinnung von  $\gamma$ -CD aus Stärke. Die erfindungsgemäßen CGTasen lassen sich dazu mittels gängiger Herstellungsverfahren nutzen.

Die Erfindung betrifft somit auch Verfahren zur Herstellung von  $\gamma$ -CD durch Umsetzung von Stärke mittels einer CGTase, dadurch gekennzeichnet, daß als CGTase mindestens eine CGTase gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 eingesetzt wird.

Gängige herstellungsverfahren zur Produktion von  $\gamma$ -CD, in denen sich die erfindungsgemäßen CGTasen anstatt der dort genannten CGTasen einsetzen lassen, sind zum Beispiel beschrieben bei:

- Journal of Fermentation and Bioengineering (1990) 70 (3), S. 190-192: Die Herstellung von  $\gamma$ -CD unter Verwendung der  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD bildenden CGTase aus *Bacillus* sp. AL-6 in Gegenwart von Äthanol, welcher eine verstärkte  $\gamma$ -CD-Produktion bewirkt.
- CA 107:57466 beschreibt die Herstellung von  $\gamma$ -CD unter Verwendung der  $\gamma$ -CGTase aus *Bacillus* sp. 313.
- EP 291,067: Herstellung von  $\gamma$ -CD unter Verwendung der CGTase aus *Bacillus macerans*. Die Produktspezifität für  $\gamma$ -CD wird durch die Zugabe eines Komplexbildners, z.B. Cyclohexadec-8-en-1-on, erreicht.
- DE 40 09 822 (entspricht US-A-5,409,824): Produktion von  $\gamma$ -CD mit der  $\gamma$ -CGTase aus *Bacillus* sp. 290-3.

$\gamma$ -CD besitzt sowohl im Vergleich zu  $\alpha$ -CD als auch im Vergleich zu  $\beta$ -CD spezifische Vorteile, die es für eine Reihe von Anwendungen als einzig mögliches oder am besten geeignetes CD ausweisen.

Im Vergleich zu  $\alpha$ -CD, das aus sechs Glukoseeinheiten aufgebaut ist, besitzt das aus acht Glukoseeinheiten bestehende  $\gamma$ -CD eine größere hydrophobe Kavität, die auch eine Komplexierung solcher Gastmoleküle ermöglicht, die aus sterischen Gründen von  $\alpha$ -CD nicht komplexiert werden können.

Im Vergleich zu  $\beta$ -CD (Löslichkeit in Wasser bei Raumtemperatur: ca. 18,5 g/l) besitzt  $\gamma$ -CD eine wesentlich höhere Löslichkeit (bei Raumtemperatur: ca. 232,0 g/l) und ist damit für Komplexierungsreaktionen aus wäßrigen Lösungen besser geeignet als  $\beta$ -CD. Ein weiterer Vorteil von  $\gamma$ -CD gegenüber  $\beta$ -CD und modifizierten  $\beta$ -CD-Derivaten ist die geringe Toxizität von  $\gamma$ -CD. Sowohl bei oraler als auch bei intravenöser Applikation sind  $\alpha$ -CD- und  $\beta$ -CD-Derivate im Tiermodell toxischer als  $\gamma$ -CD.

Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der Erfindung.

#### Beispiel 1: Mutagenese der CGTase aus *Bacillus circulans* #8 (DSM 10559)

Die Deletion beliebiger Aminosäurereste im erfindungsgemäßen Bereich der Aminosäurereste 155 - 195, insbesondere die Deletion der sechs Aminosäurereste M E T D T S (Seq. ID No. 5) an der Position 179-184 in der  $\beta$ -CGTase aus *Bacillus circulans* #8 (vgl. Tab. 1; Hinterlegt bei der DSMZ Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig unter der Nummer DSM 10559) wird erreicht, indem die für die entsprechenden Aminosäurereste kodierenden Basentriplets des CGTase-Strukturgens in einer dem Fachmann an sich bekannten Art und Weise deletiert werden.

Zur Mutagenese wurde das  $\beta$ -CGTase-Gen aus *Bacillus circulans* #8 zunächst in den kommerziell erhältlichen *E. coli*-Vektor pUC19 (Boehringer, Mannheim) kloniert. Dazu wurde wie bei Ausubel F.M., Current protocols in molecular biology, vol. 1; Greene Publishing Associates & Wiley - Interscience, N. Y. beschrieben chromosomale DNS aus *Bacillus circulans* #8 (Appl. Microbiol. Biotechnol. (1990) 33: Seite 542 - 546) isoliert und mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und XbaI (Boehringer, Mannheim) gespalten. Fragmente in einem Größenbereich zwischen zwei und fünf kb wurden isoliert und zusammen mit einer mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und XbaI (Boehringer, Mannheim) gespaltenen pUC19-DNS und T4 DNS-Ligase bei 16°C für 12 Stunden inkubiert. Der Ligationsansatz wurde zur Transformation von *E. coli* K 12-Zellen, die mit bekannten Verfahren (Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory (1982), N.Y.) kompetent für die Aufnahme von DNS gemacht wurden, verwendet. Aus solchen *E. coli*-Zellen, die nach der Transformation auf Stärke enthaltenden Indikatorplatten Stärkeabbauhöfe bildeten,

wurde das rekombinante Plasmid, welches das Gen für die  $\beta$ -CGTase aus *Bacillus circulans* #8 trägt, isoliert (Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory (1982), N.Y., S. 86-92).

Die Mutagenese dieses Gens wurde mit dem von der Firma Amersham (Braunschweig) kommerziell vertriebenen 'Oligonucleotide - directed in vitro mutagenesis system, version 2.1', basierend auf einem von Eckstein entwickelten Verfahren (Nucl. Acids. Res. (1986) 14, S. 9679-9698 und Nucl. Acids. Res. (1988) 16, S. 791-802) durchgeführt. Die Mutagenese wurde exakt nach dem Protokoll durchgeführt, welches dem genannten Mutagenesesystem der Fa. Amersham beiliegt. Das Verfahren wird im folgenden summarisch wiedergegeben. Details sind dem Protokoll des genannten Mutagenesesystems zu entnehmen.

Unter Verwendung kommerziell erhältlicher Enzyme wie Restriktionsendonukleasen und T4 DNS-Ligase (Boehringer, Mannheim) wurde ein solcher Teil des in pUC19 klonierten Gens für die  $\beta$ -CGTase aus *Bacillus circulans* #8, der für den erfindungsgemäßen Bereich von Aminosäurerest 155 bis 195 dieser CGTase kodiert, in den kommerziell erhältlichen Vektor M13 (New England Biolabs) kloniert. Ein Beispiel für ein solches Fragment ist ein 1,6 kb großes AccI-Fragment. Dieses Fragment wurde in den mit der Restriktionsendonuklease AccI gespaltenen M13-Vektor kloniert.

Aus solchen *E. coli*-Wirtszellen, die den rekombinanten M13-Vektor aufgenommen hatten, wurde nach der von Amersham mit dem oben genannten Mutagenese-System gelieferten Versuchsprotokoll einzelsträngige, rekombinante M13-DNS (Vorlagen-DNS) isoliert.

Zur eigentlichen Mutagenese wurden chemisch definierte Mutageneseoligonukleotide mit jeweils erwünschter Sequenz synthetisiert. Solche Oligonukleotide sind beispielsweise bei der Fa. MWG (Ebersberg) käuflich erhältlich. Die Sequenz des Mutageneseoligonukleotids wurde so gewählt, daß die Abfolge der Basen in dem Mutageneseoligonukleotid invers komplementär zu dem Teil der Nukleotidsequenz der Vorlagen-DNS ist, der die in der Vorlagen-DNS enthaltenen, zu deletierenden Basentriplets der  $\beta$ -CGTase aus *Bacillus circulans* #8 jeweils 15 Basen stromauf und stromab umgibt.

In Tab. 2 ist die Sequenzen des verwendeten Mutageneseoligonukleotids dargestellt.

Tab.2

5'- CAC ACC TCT CCA GCG TTT GCC GAA AAT GGC -3' (Seq. ID.No 6)

Der Einsatz des in Tab.2 dargestellten Mutageneseoligonukleotids führte zu einem  $\beta$ -CGTase-Genfragment, das für ein Aminosäurefragment kodiert, bei dem die sechs Aminosäurereste M E T D T S (Seq. ID No. 5) deletiert sind.

Das Mutageneseoligonukleotid wurde am 5'-Ende unter Verwendung von T4 Polynukleotid-Kinase und ATP (Amersham) phosphoryliert. Das phosphorylierte Mutageneseoligonukleotid wurde an die homologen Bereiche der Vorlagen-DNS gebunden. Dazu wurden 5  $\mu$ g einzelsträngiger Vorlagen-DNS mit ca. 4 pMol des phosphorylierten Mutageneseoligonukleotids für drei Minuten bei 70°C und dann für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Synthese eines zur Vorlagen-DNS, mit Ausnahme der zu deletierenden Nukleotide, komplementären DNS-Strangs, wobei das an die Vorlagen-DNS gebundene Mutageneseoligonukleotid als Startpunkt der Synthese und die Vorlagen-DNS als Vorlage für die Neusynthese des mutierten DNS-Strangs diente. Die Synthese selbst erfolgte nach Zugabe des Klenow-Fragments der DNS-Polymerase (Amersham), einer T4 DNS-Ligase und eines Nukleotidmixes, der die Nukleotide dATP, dGTP, dTTP und anstelle des dCTP das Thionukleotid dCTPS (Amersham) enthält, über 15 Stunden bei 16°C.

Aus diesem Syntheseansatz wurden verbliebene Moleküle einzelsträngiger Vorlagen-DNS entfernt. Dazu wurde der Ansatz mit NaCl versetzt und über einen Nitrozellulosefilter (Amersham) filtriert, der spezifisch einzelsträngige DNS bindet. Die im Durchlauf verbliebene doppelsträngige Hybrid-DNS wurde durch eine EtOH-Fällung konzentriert und entsalzt. Anschließend wurde die Hybrid-DNS mit NciI (Amersham), einer Restriktionsendonuklease, die die Nukleotidsequenz CC(G/C)GG erkennt, aber nur native DNS-Stränge, nicht jedoch solche, die das Nukleotid-Analogon dCTPS enthalten, spaltet, in geeignetem Inkubationspuffer (Amersham) für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch diese Behandlung wurden nur in den nicht mutagenisierten Strang (Vorlagen-DNS) Brüche eingeführt.

Bei einer 30 minütigen Behandlung bei 37°C mit Exonuklease III (Amersham), einem Enzym, das DNS-Strang von freien Enden her abbaut, wurde die Vorlagen-DNS dann entfernt. Nach einer thermischen Inaktivierung der Exonuklease III (15 Minuten bei 70°C) wurde der verbliebene, einzelsträngige und mutagenisierte DNS-Strang mit DNS-Polymerase I (Amersham), T4 DNS-Ligase und den Nukleotiden dATP, dTTP, dCTP und dGTP für 3 Stunden bei 16°C inkubiert. Dabei wurde die mutagenisierte Einzelstrang-DNS zum Doppelstrang ergänzt. Nach einer weiteren EtOH-Fällung zur Reinigung wurde die mutagenisierte DNS in kompetente *E. coli* K12-Zellen transformiert.

Durch die Sequenzanalyse des betreffenden Bereichs der rekombinanten DNS aus fünf der bei der Transformation erhaltenen Klone wurde der Erfolg der Mutagenese-prozedur kontrolliert. Aus einem Vektor, bei dem eine Mutation bestätigt wurde, wurde das zur Mutagenese ursprünglich in M13 klonierte DNS-Fragment mit den Restriktionsenzymen XhoI und NdeI herausgespalten.



Anschließend wurde das entsprechende, jedoch nicht mutagenisierte XhoI/NdeI-Fragment aus dem auf pUC19 basierenden Expressionsplasmid für die  $\beta$ -CGTase aus *Bacillus circulans* #8 herausgespalten und unter Verwendung von T4 DNS-Ligase durch das mutagenisierte Fragment ersetzt.

**Beispiel 2: Mutagenese der  $\beta$ -CGTase aus *Bacillus* sp. 1-1**

Analog zu der in Beispiel 1 dargestellten Methode wurden die sechs Codonen des  $\beta$ -CGTase-Gens aus *Bacillus* sp. 1-1, die für die Aminosäurereste L E T N P N (Seq. ID No. 7) an Position 167 - 172 der entsprechenden CGTase (vgl. Tab. 1) kodieren, unter Verwendung des in Tabelle 3 dargestellten Oligonukleotides deletiert (A) in Bsp.8, Vergleich 2). Die gleiche Deletion wurde auch in ein in DE 43 24 650 A1 beschriebenes Derivat dieser CGTase, bei dem durch einen Aminosäureaustausch (Tyr  $\Rightarrow$  Trp) die  $\gamma$ -CD - Spezifität im Vergleich zum Wildtypenzym bereits erhöht wurde, eingebracht (B) in Bsp.8, Vergleich 2)

Tab. 3

5'- CAT TCA TCA CCG GCA TAT GTT GAA AAT GGG -3' (Seq.ID No. 8)

**Beispiel 3: Produktion der  $\beta$ -CGTase aus *Bacillus circulans* #8 und ihrer erfindungsgemäßen Derivate in *E. coli***

Zur Produktion der  $\beta$ -CGTase aus *Bacillus circulans* #8 und ihres gemäß Bsp. 1 hergestellten Derivats wurden die in Beispiel 1 beschriebenen Expressionsplasmide auf pUC19-Basis in einen *E. coli*-Sekretionsstamm transformiert. Als *E. coli*-Sekretionsstamm wurde *E. coli* WCM105 verwendet. Dieser Stamm wurde, wie in EP 338410 beschrieben, aus *E. coli* DS 410 hergestellt.

Zur Produktion der  $\beta$ -CGTase aus *Bacillus circulans* #8 oder deren Derivat wurden daher Zellen von *E. coli* WCM105, die geeignete CGTase-Expressionsplasmide enthalten, in LB-Medium (Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory (1982), N.Y.), das 10 g/l Laktose und 0,1 g/l Ampicillin enthält, für 72 Stunden bei 30°C in einem Wasserbadschüttler (Drehzahl 250 Upm) inkubiert. Dann wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5000 x g abgetrennt. Der zellfreie Kulturüberstand enthält die  $\beta$ -CGTase oder deren Derivate.

**Beispiel 4: Produktion der  $\beta$ -CGTase aus *Bacillus* sp. 1-1 und ihrer erfindungsgemäßen Derivate in *E. coli***

Die Produktion erfolgte analog Beispiel 3 unter Verwendung der in Bsp. 2 beschriebenen Expressionsplasmide.

**Beispiel 5: Reinigung von CGTasen mittels Adsorption an trägergebundenes  $\beta$ -Cyclodextrin**

Eine spezifische und schonende Reinigung von CGTasen erfolgt über eine Affinitätsreinigung mittels an Sepharose gekoppelte  $\beta$ -CD - Moleküle.

1 g Epoxy - aktivierte Sepharose 6B (Sigma) wird mit 3 x je 10 ml H<sub>2</sub>O und anschließend 1 x 5 ml 0,1 N NaOH gewaschen. Anschließend wird die Sepharose 6B in 2 ml einer 2,8 % igen (w/v) Lösung aus  $\beta$ -CD in 0,1 N NaOH suspendiert und 20 h bei 45°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Dann wird das Kopplungsprodukt aus  $\beta$ -CD und Sephadex 6B mit 2 x 5 ml H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach Suspendierung des gewaschenen Materials in einer 2,5 % - igen (w/v) Glukoselösung in H<sub>2</sub>O wird das Material zur Absättigung der verbliebenen freien Kopplungsstellen für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wird successive mit 2 x 5 ml H<sub>2</sub>O, 2 x 5 ml 0,1 M Boratpuffer pH 8,0, 2 x 5 ml 0,1 M Acetatpuffer pH 4,0 und 2 x 2 ml 20 mM Triethanolamin/Cl pH 7,2 gewaschen. Das Kopplungsprodukt wird mit 0,2 ml 20 mM Triethanolamin/Cl pH 7,2 versetzt (Endvolumen ca. 2 - 2,5 ml) und bei 4°C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

Zur spezifischen Bindung von CGTasen an das an Sepharose 6B gekoppelte  $\beta$ -CD (CD-Sepharose) werden die nach Beispiel 3 oder 4 erhaltenen, zellfreien, CGTase-haltigen Kulturüberstände mit 0,2 ml der CD-Sepharose versetzt und für 1,5 h bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Dabei koppelt das Enzym an die CD-Sepharose. Der Enzym - CD-Sepharose - Komplex wird durch Zentrifugation (5 min 4000 x g) gewonnen und mit 2 x 10 ml 20 mM Triethanolamin/Cl pH 7,2 gewaschen. Anschließend wird das CGTase - Enzym durch Inkubation des Komplexes für 1,5 h bei 4°C mit 2 ml einer 1%-igen  $\beta$ -CD - Lösung in 20 mM Triethanolamin/Cl pH 7,2 eluiert. Nach einer abschließenden Zentrifugation (5 min, 4000 x g) wird der die gereinigte CGTase enthaltende Überstand abgenommen.

Vor einer Charakterisierung der so gereinigten CGTasen muß noch das in der Lösung enthaltene, zur Elution verwendete  $\beta$ -CD entfernt werden. Dazu wird eine kommerziell erhältliche PD-10 - Säule (Sephadex G-25 M; Pharmacia) mit 35 ml 20 mM Tris/Cl pH 7,2 und 5 mM CaCl<sub>2</sub> (TC-Puffer) equilibriert. Die  $\beta$ -CD - haltige Lösung wird mit TC-Puffer auf ein Volumen von 2,5 ml aufgefüllt und auf die Säule aufgetragen. Anschließend wird mit 3,5 ml TC-Puffer eluiert.

Das dabei erhaltene Eluat enthält die gereinigte,  $\beta$ -CD - freie CGTase.

#### Beispiel 6: Konversion von Stärke zu Cyclodextrinen

Die Bestimmung der Aktivitäten von CGTasen erfolgte nach der in Eur. J. Biochem. (1990) 191, S. 177-185 beschriebenen Methode.

Verschiedene Mengen einer zu testenden CGTase-Lösung wurden mit einer 5 %-igen Lösung einer löslichen Stärke (Merck, Darmstadt) in einem Puffer bestehend aus 20 mM Tris/HCl pH 7,2 und 5 mM  $\text{CaCl}_2$  für eine definierte Zeit bei 45°C inkubiert. Nach der Zeit wurde die Reaktion durch die Zugabe von 1,5 Volumenteilen Methanol beendet. Nicht umgesetzte Reststärke wurde durch eine einstündige Inkubation bei 4°C gefällt und durch Zentrifugation (10 min, 12000 x g) abgetrennt. Die entstandenen Produkte wurden über HPLC an einer Nukleosil 10-NH<sub>2</sub>-Säule (Macherey & Nagel, Düren) bestimmt, wobei definierte Cyclodextrine (Sigma, München) als Standard dienten. Als eine Einheit (1 U) wird die Enzymmenge definiert, die unter den beschriebenen Bedingungen 1  $\mu\text{M}$  Cyclodextrine pro Minute aus Stärke bildet.

#### Beispiel 7: Die Bestimmung der spezifischen Gesamt-CGTase-Aktivitäten von gereinigten CGTasen

Die spezifische Gesamt-CGTase-Aktivität gereinigter CGTasen ist definiert als Volumenaktivität pro Proteinmenge (U/mg).

Die CGTase - Volumenaktivität (U/ml) einer Enzymprobe wird, wie in Beispiel 6 beschrieben, ermittelt.

Der Proteingehalt (mg/ml) einer Lösung der gereinigten CGTase wird nach der von M. Bradford (Anal. Biochem. (1976) 72, Seite 248 ff) beschriebenen Methode durchgeführt. Die dazu benötigten Chemikalien werden von der Firma Bio-Rad bezogen.

Für die  $\beta$ -CGTasen aus *Bacillus circulans* #8 und *Bacillus* sp. 1-1, sowie die daraus (wie in Beispiel 1 und Beispiel 2 beschrieben) erzeugten Deletionsmutanten wurden folgende spezifische Gesamt-CGTase-Aktivitäten (spez. Aktivität) ermittelt:

Enzym	rel. Aktivität (%)	spez. Aktivität (U/mg)
Wildtyp CGTase aus <i>Bacillus circulans</i> #8	100	106
davon abgeleitete Deletionsmutante	77	82
Wildtyp CGTase aus <i>Bacillus</i> sp. 1-1	100	120
davon abgeleitete Deletionsmutante	65	78
Mutiertes Derivat (TyrTrp) der CGTase aus <i>Bacillus</i> sp. 1-1	100	23
davon abgeleitete Deletionsmutante	73	17

#### Beispiel 8: Konversion von Stärke unter Einsatz der nicht mutagenisierten $\beta$ -CGTasen aus *Bacillus circulans* #8 und *Bacillus* sp. 1-1, sowie den gemäß Bsp. 3 und 4 hergestellten Derivaten.

Zum Vergleich der Produktspektren der nicht mutagenisierten CGTasen mit den jeweils, wie in den Beispielen 1 und 2 beschrieben, durch Deletionsmutagenese daraus erhaltenen Derivate wurden gleiche Enzymaktivitäten zur Stärkekonzersion (Beispiel 6) eingesetzt. Zu definierten Zeitpunkten wurde die Produktzusammensetzung wie beschrieben untersucht. Es wurden folgende Resultate erhalten:

# EP 0 802 259 A1

## Vergleich 1: Bacillus circulans #8

5

10

Zeit (min)	Wildtyp-CGTase				Deletionsmutante davon			
	$\alpha$ -CD (%)	$\beta$ -CD (%)	$\gamma$ -CD (%)	$\gamma/(\alpha+\beta)$	$\alpha$ -CD (%)	$\beta$ -CD (%)	$\gamma$ -CD (%)	$\gamma/(\alpha+\beta)$
5	13	70	17	0,2	9	58,0	33	0,49
10	13,5	70,3	16,2	0,19	8,2	60,5	31,3	0,46
15	11,7	66,3	22,0	0,28	9,4	62,0	28,6	0,40

15

## Vergleich 2: Bacillus sp. 1-1

20

25

30

A)

Zeit (min)	Wildtyp-CGTase				Deletionsmutante davon			
	$\alpha$ -CD (%)	$\beta$ -CD (%)	$\gamma$ -CD (%)	$\gamma/(\alpha+\beta)$	$\alpha$ -CD (%)	$\beta$ -CD (%)	$\gamma$ -CD (%)	$\gamma/(\alpha+\beta)$
5	0	100	0	0	0	68	32	0,47
10	0	88	12	0,14	0	68	32	0,47
15	0	88	12	0,14	0	67,7	32,3	0,48

35

40

45

50

55

B)

Zeit (min)	Wildtyp-CGTase				Deletionsmutante davon			
	$\alpha$ -CD (%)	$\beta$ -CD (%)	$\gamma$ -CD (%)	$\gamma/(\alpha+\beta)$	$\alpha$ -CD (%)	$\beta$ -CD (%)	$\gamma$ -CD (%)	$\gamma/(\alpha+\beta)$
5	0	27	73	2,7	0	0	100	-
10	0	31	69	2,23	0	22	78	3,54
15	0	32,5	67,5	2,08	0	16,6	83,4	5,02

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Consortium fuer elektrochemische Industrie  
GmbH

(B) STRASSE: Zielstattstrasse 20

(C) ORT: Muenchen

(D) BUNDESLAND: Bayern

(E) LAND: Deutschland

(F) POSTLEITZAHL: 81379

(G) TELEFON: 049-89-74844-0

(H) TELEFAX: 049-89-74844-350

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Cyclodextringlykosyltrans-  
ferasen zur Produktion von gamma-Cyclodextrin

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 8

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 24 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM:

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

5 (v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

10 (A) ORGANISMUS: *Bacillus ohbensis*

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

15 Pro Asn His Ser Ser Pro Ala Leu Glu Thr Asp Pro Ser Tyr Ala Glu  
1 5 10 15

20 Asn Gly Ala Val Tyr Asn Asp Gly  
20

25 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

30 (A) LÄNGE: 24 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

35 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

40 (v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

45 (A) ORGANISMUS: *Bacillus macerans*

50 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

55

Pro Asn His Thr Ser Pro Ala Asp Arg Asp Asn Pro Gly Phe Ala Glu  
1 5 10 15

Asn Gly Gly Met Tyr Asp Asn Gly  
20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 24 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM:

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Bacillus sp. 1-1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Pro Asn His Ser Ser Pro Ala Leu Glu Thr Asn Pro Asn Tyr Val Glu  
1 5 10 15

Asn Gly Ala Ile Tyr Asp Asn Gly  
20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 24 Aminosäuren

- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Bacillus circulans #8

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Pro	Asn	His	Thr	Ser	Pro	Ala	Met	Glu	Thr	Asp	Thr	Ser	Phe	Ala	Glu
1				5					10					15	

Asn	Gly	Arg	Leu	Tyr	Asp	Asn	Gly
							20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Met Glu Thr Asp Thr Ser  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetisch"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(viii) POSITION IM GENOM:

(C) EINHEITEN: bp

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

CACACCTCTC CAGCGTTTGC CGAAAATGGC

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure



(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Leu Glu Thr Asn Pro Asn  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 30 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "synthetisch"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(viii) POSITION IM GENOM:

(C) EINHEITEN: bp

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

CATTCATCAC CGGCATATGT TGAAAATGGG

30

Patentansprüche

1. CGTasen, welche bei der Umsetzung von Stärke oder stärkeähnlichen Substraten zu CD in erhöhtem Ausmaß  $\gamma$ -CD produzieren und noch mindestens 60 % der spezifischen Gesamt-CGTase-Aktivität der zur Herstellung des betreffenden Enzyms verwendeten Ausgangs-CGTase aufweisen, dadurch gekennzeichnet, daß sich ihre Aminosäuresequenz von der Aminosäuresequenz bekannter CGTasen im Bereich von Aminosäureposition 155 bis einschließlich Aminosäureposition 195 durch die Deletion mindestens einer Aminosäure unterscheidet, wobei Position 1 der Proteinsequenz der Beginn des Signalpeptids der CGTase ist und die Deletion die Erhöhung der  $\gamma$ -CGTase Aktivität des Proteins bewirkt.
2. CGTase gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß im Bereich zwischen Aminosäureposition 155 und Aminosäureposition 195 ihrer Proteinsequenz zwischen vier und acht Aminosäurereste deletiert sind, wobei Position 1 der Proteinsequenz der Beginn des Signalpeptids der CGTase ist und die Deletion die Erhöhung der  $\gamma$ -CGTase Aktivität des Proteins bewirkt.
3. CGTase gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß im Bereich zwischen Aminosäureposition 155 und Aminosäureposition 195 ihrer Proteinsequenz sechs Aminosäurereste deletiert sind, wobei Position 1 der Proteinsequenz der Beginn des Signalpeptids der CGTase ist und die Deletion die Erhöhung der  $\gamma$ -CGTase Aktivität des Proteins bewirkt.
4. CGTase gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sich ihre Aminosäuresequenz von den Aminosäuresequenzen der in Tab. 1 genannten CGTasen zumindest durch die Deletion der in Tab. 1 jeweils fettgedruckten Aminosäurereste unterscheidet, wobei die übrige Aminosäuresequenz der erfindungsgemäßen CGTase zur Aminosäuresequenz der CGTase aus dem jeweils in Tabelle 1 genannten Mikroorganismus soweit homolog ist, daß die Sequenz ohne die erfindungsgemäße Deletion CGTase Aktivität aufweist.
5. Verfahren zur Herstellung von mutierten CGTase Genen, welche für erfindungsgemäße CGTasen kodieren, dadurch gekennzeichnet, daß die DNS-Sequenz eines für eine Ausgangs-CGTase kodierenden Gens mittels an sich bekannter Mutagenesemethoden derart mutiert wird, daß sich die durch die DNS-Sequenz des mutierten Gens kodierte Aminosäuresequenz im Bereich zwischen Aminosäureposition 155 und 195 von der durch die DNS des unmutierten Gens kodierten Aminosäuresequenz durch die Deletion mindestens eines Aminosäurerestes unterscheidet.
6. Verfahren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die DNS-Sequenz eines für eine Ausgangs-CGTase kodierenden Gens mittels an sich bekannter Mutagenesemethoden derart mutiert wird, daß die durch die DNS-Sequenz des mutierten Gens kodierte Aminosäuresequenz sich von der durch die DNS des unmutierten Gens kodierten Aminosäuresequenz durch die Deletion von vier bis acht Aminosäureresten im Bereich zwischen Aminosäureposition 155 und 195 unterscheidet.
7. Verfahren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die DNS-Sequenz eines für eine Ausgangs-CGTase kodierenden Gens mittels an sich bekannter Mutagenesemethoden derart mutiert wird, daß die durch die DNS-Sequenz des mutierten Gens kodierte Aminosäuresequenz sich von der durch die DNS des unmutierten Gens kodierten Aminosäuresequenz durch die Deletion von sechs Aminosäureresten im Bereich zwischen Aminosäureposition 155 und 195 unterscheidet.
8. DNS-Sequenzen dadurch gekennzeichnet, daß sie für CGTasen gemäß Anspruch 1 kodieren.
9. Verfahren zur Herstellung von  $\gamma$ -CGTasen dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine DNS-Sequenz gemäß

**EP 0 802 259 A1**

Anspruch 8 in einem Mikroorganismus exprimiert wird.

10. Verfahren zur Herstellung von gamma-CD durch Umsetzung von Stärke mit einer CGTase, dadurch gekennzeichnet, daß als CGTase mindestens eine CGTase gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4 eingesetzt wird.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55



Europäisches  
Patentamt

## EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 97 10 6357

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kenzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
A	EP 0 630 967 A (CONSORTIUM ELEKTROCHEM IND) 28.Dezember 1994 * das ganze Dokument *	1-10	C12N15/54 C12N9/10 C12P19/18
A	--- DATABASE WPI Section Ch, Week 9514 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 95-100943 XP002034113 & JP 07 023 781 A (OJI CORN STARCH CO LTD) , 27.Januar 1995 * Zusammenfassung *	1-10	
A	--- DATABASE WPI Section Ch, Week 9339 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 93-308317 XP002034114 & JP 05 219 948 A (UOZUMI T) , 31.August 1993 * Zusammenfassung *	1-10	
A	--- DATABASE WPI Section Ch, Week 9313 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 93-103608 XP002034115 & JP 05 041 985 A (OJI CORN STARCH CO LTD) , 23.Februar 1993 * Zusammenfassung *	1-10	C12N C12P
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 2.Juli 1997	Prüfer Hornig, H
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument * : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 1501 (01/97) (PM COI)



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 97 10 6357

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
A	BIOTECHNOLOGY AND APPLIED BIOCHEMISTRY, Bd. 12, Nr. 4, August 1990, ACADEMIC PRESS, INC., NEW YORK, US, Seiten 387-396, XP002034109 J. HELLMAN ET AL.: "Effects of modifications at the C-terminus of cyclomaltodextrin glucanotransferase from Bacillus circulans var. alkalophilus on catalytic activity" * das ganze Dokument *	1-10	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
A	J. BIOTECHNOLOGY, Bd. 32, Nr. 3, 28. Februar 1994, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Seiten 283-288, XP002034110 K.-A. SIN ET AL.: "Replacement of an amino acid residue of cyclodextrin glucanotransferase of Bacillus ohbensis doubles the production of gamma-cyclodextrin" * das ganze Dokument *	1-10	
A	BIOCHEMISTRY, Bd. 34, Nr. 10, 14. März 1995, AM. CHEM. SOC., WASHINGTON, DC, US, Seiten 3368-3376, XP002034111 D. PENNINGA ET AL.: "Site-directed mutations in tyrosine 195 of cyclodextrin glycosyltransferase from Bacillus circulans strain 251 affect activity and product specificity" * das ganze Dokument *	1-10	
A	EP 0 481 903 A (ORSAN ;MERCAN CORP (JP)) 22. April 1992 * das ganze Dokument *	1-10	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchesort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 2. Juli 1997	Prüfer Hornig, H
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, Übereinstimmendes Dokument	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer andern Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			

EPO FORM 150 01.92 (P04C01)



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 97 10 6357

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
A	WO 91 14770 A (CONSORTIUM ELEKTROCHEM IND) 3.Oktober 1991 * das ganze Dokument *	1-10	
A	EP 0 614 971 A (AMANO PHARMA CO LTD) 14.September 1994 * das ganze Dokument *	1-10	
A	J. OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, Bd. 74, Nr. 6, - 1992 SUITA, JAPAN, Seiten 345-351, XP002034112 N. KITAMOTO ET AL.: "Cloning and sequencing of the gene encoding cyclodextrin glucanotransferase from Bacillus sp. KC201" * Abbildung 4 *	1-10	
P,A	WO 96 33267 A (NOVONORDISK AS ;DIJKHUIZEN LUBBERT (NL); DIJKSTRA BAUKE W (NL); AN) 24.Oktober 1996 * das ganze Dokument *	1-10	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 2.Juli 1997	Prüfer Hornig, H
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument ----- & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 150 (12/91) (PMO)